

努比亞山羊黏多醣症基因型之即時聚合酶鏈鎖反應檢測方法應用 Diagnosis of caprine mucopolysaccharidosis type IIID by the application of Real-time PCR platform

朱家德⁽¹⁾ 林德育⁽¹⁾ 賴永裕⁽¹⁾ 陳若菁⁽¹⁾ 吳明哲⁽¹⁾ 張秀鑾⁽²⁾

⁽¹⁾行政院農業委員會畜產試驗所 ⁽²⁾國立屏東科技大學

C. T. Chu⁽¹⁾, D. Y. Lin⁽¹⁾, Y. Y. Lai⁽¹⁾, J. C. Chen⁽¹⁾, M. C. Wu⁽¹⁾ and H. L. Chang⁽²⁾

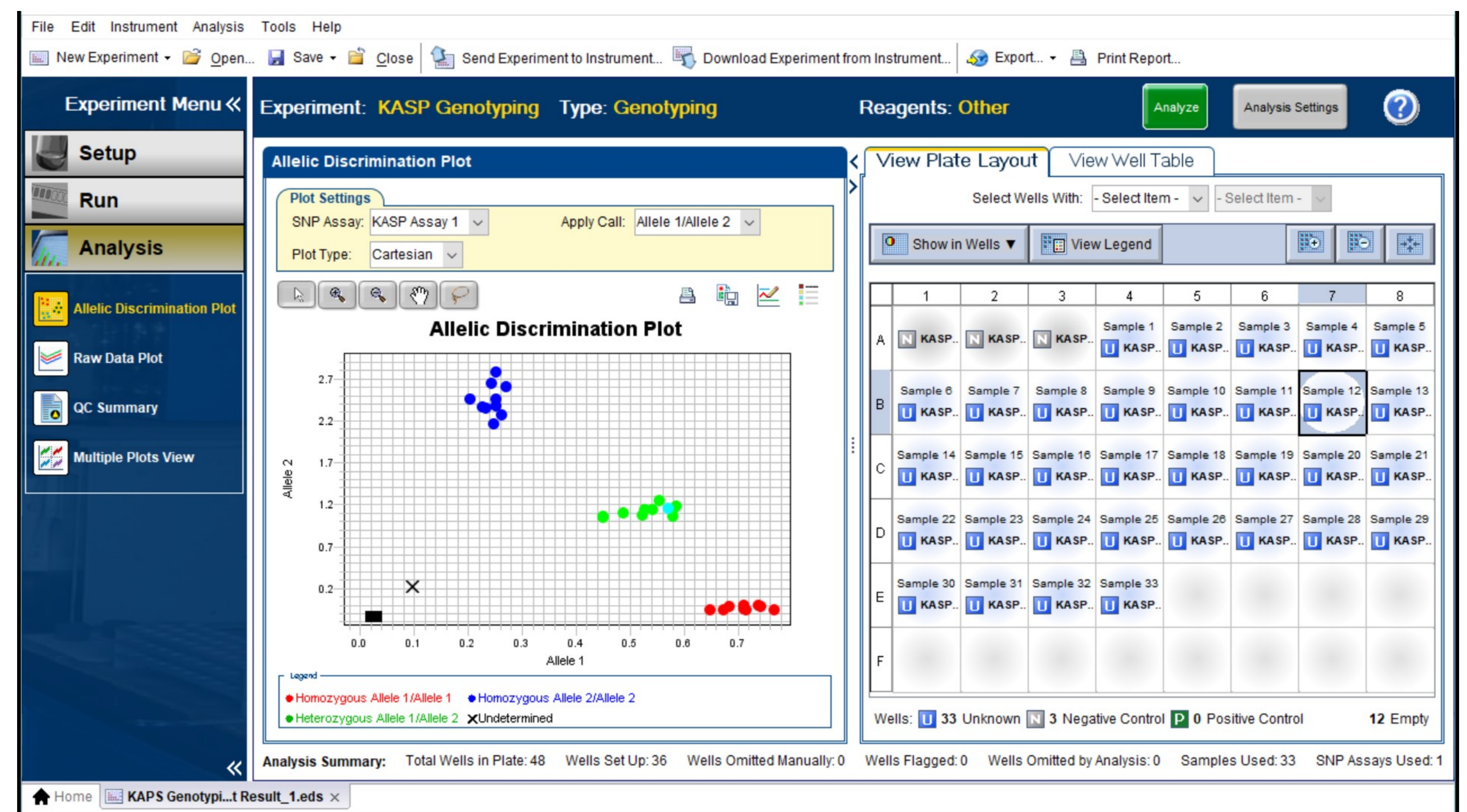
⁽¹⁾Taiwan Livestock Research Institute ⁽²⁾National Pingtung University of Science and Technology

緒言

山羊黏多醣症 (Mucopolysaccharidosis, MPS) IIID型，是一種遺傳缺陷所導致的代謝性疾病。黏多醣學名為醣胺多醣 glycosaminoglycans (GAGs)，是體內含量最豐富的多醣體；因GAGs的溶液態具有高黏度，故稱為黏多醣 mucopolysaccharide。黏多醣症的發生是因為黏多醣分解中所需的酵素缺乏或異常所造成的疾病，因此造成細胞內GAGs的累積，目前尚無治癒此疾病的醫學解決方案(李及蔡，2000)。人類已發現的黏多醣症共分為七型(MPS I、II、III、IV、VI、VII、IX)，不同型下尚有不同的亞型，各為不同的溶解酶(lysozyme)缺乏或異常所引起；同一亞型內亦曾檢測出多種不同的分生突變(Jansen *et al.*, 2007)除第二型為X-性聯隱性遺傳外，其他的均為體染色體隱性遺傳。黏多醣症症狀複雜多變，除了生長遲滯、外貌變形、生理功能損害外，亦有造成麻醉危險的案例報告(陳等，2001)。據線上動物孟德爾遺傳資料庫收集統計(Online Mendelian Inheritance in Animals, OMIA)，黏多醣症除人類外，在狗、貓、牛、山羊、鴝(emu)等亦有發生。而目前發現於山羊的黏多醣症是歸類於MPS IIID型(相當於人類黏多醣症第三型聖菲利柏氏症D型)，僅有單一品種努比亞(Nubian)山羊的GNS(N-acetylglucosamine-6-sulphatase, 又稱G6S)基因的單點突變的分子生物報告(Cavanagh *et al.*, 1995; Thompson *et al.*, 1992)，為一簡單的隱性基因遺傳，其突變點的位置在G6S cDNA第322個核苷酸上(C→T)。

材料與方法

本試驗努比亞山羊為民間種羊場業者提供21頭種羊血液樣本。依據Thompson(1992)及Cavanagh(1995)等人發現山羊黏多醣症IIID型GNS(N-acetylglucosamine-6-sulphatase, 又稱G6S)基因cDNA第322個核苷酸上(C→T)單點突變。至今已發開出多種檢測山羊G6S基因cDNA第322個核苷酸突變點技術，如聚合酶鏈鎖反應-限制性長度片段多態性分析(PCR-RFLP)、單股構型多態性(single-strand conformation polymorphism, SSCP)及運用螢光探針(TaqMan Probe)標記之即時聚合酶連鎖反應(Real-time polymerase chain reaction)等。本研究以螢光引子(FAM/HEX-labelled Primer)標記之即時聚合酶連鎖反應(Kompetitive Allele-Specific PCR, KASP)基因型檢測技術，分析判斷努比亞山羊黏多醣症之正常型及有病型個體，藉此降低檢測時間與檢測成本。

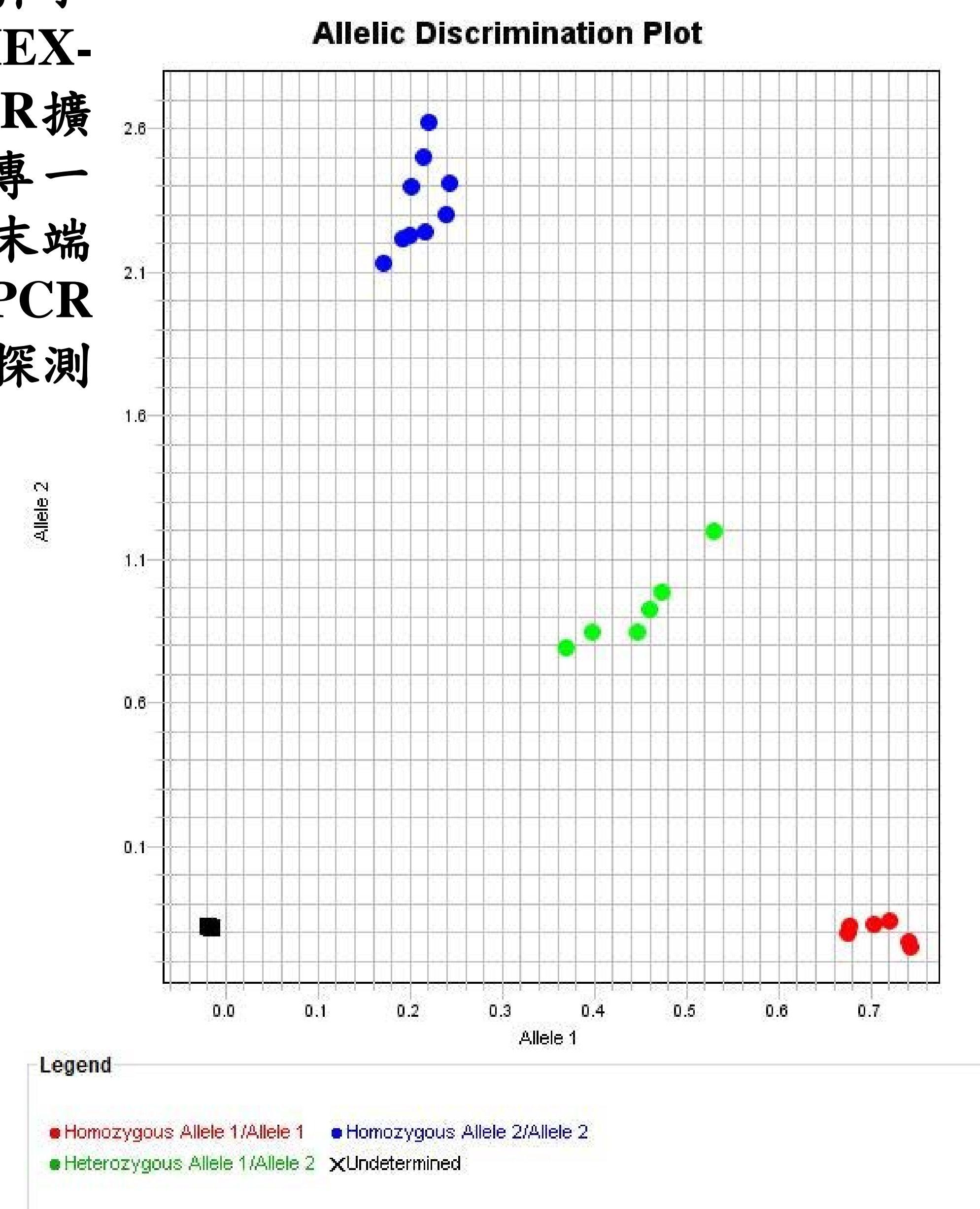


圖一 運用KASP基因型檢測技術分析孔盤樣本及基因型分布之對照圖。

KASP基因型檢測技術原理為藉由兩股分別能辨識突變點鹼基引子，其引子5'末端各自帶有FAM/HEX-labelled標記之螢光，故在PCR擴增反應下，引子能藉由高度專一性的3'辨識單點突變及引子5'末端不同螢光標記而在Real-time PCR儀器(ABI StepOne)吸光值探測上區分不同基因型。

結果與討論

運用KASP基因型檢測技術結果顯示，正常型基因型者具FAM藍色螢光，雜合型基因型者同時具FAM/HEX呈現綠色螢光，而有病型基因型者則具HEX紅色螢光。初步實驗結果顯示，以KASP基因型檢測技術做為判斷努比亞山羊黏多醣症之正常型及有病型個體，可為另一種迅速判定山羊GNS黏多醣症基因型之檢測模式。



圖二 運用KASP基因型檢測技術分析努比亞山羊黏多醣症之正常型、雜合型及有病型分布圖。